

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19)

JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **63119688 A**(43) Date of publication of application: **24.05.88**

(51) Int. Cl

**C12P 13/14****C12N 1/20****C12N 15/00****C12P 13/24**

///(**C12P 13/14** , **C12R 1:13** ), (**C12P 13/14**  
 , **C12R 1:15** ), (**C12P 13/24** , **C12R 1:13**  
 ), (**C12P 13/24** , **C12R 1:15** )

(21) Application number: **61265297**(22) Date of filing: **07.11.86**(71) Applicant: **KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD**

(72) Inventor: **KATSUMATA RYOICHI**  
**YOKOI HARUHIKO**  
**KINO KUNIKI**

**(54) PRODUCTION OF L-GLUTAMIC ACID AND L-PROLINE****(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To produce L-glutamic acid and L-proline, by culturing a microorganism belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus and containing a specific recombinant DNA.

**CONSTITUTION:** A microorganism belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus and containing a recombinant DNA derived from a vector DNA and a DNA fragment carrying genetic information participating in the synthesis of citric acid synthase (CS) of microorganism is cultured in a medium. Concrete examples of the transformant strain having a recombinant DNA containing a CS gene are *Corynebacterium glutamicum* K70 (FERM BP-1161) produced by including a recombinant plasmid pEgltA-2

containing CS gene of *E.coli* in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 31833 strain and *Corynebacterium glutamicum* K71 (FERM BP-1162) produced by including a recombinant plasmid pCgltA-1 containing CS gene of *Corynebacterium glutamicum* in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 31833.

COPYRIGHT: (C)1988,JPO&amp;Japio

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平 7 - 1 2 1 2 2 8

(24) (44) 公告日 平成 7 年 (1995) 12 月 25 日

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C12P 13/14		A 2121-4B	
C12N 15/09			
C12P 13/24		A 2121-4B	
//(C12P 13/14		A	
C12R 1:15 )			

発明の数 1 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願昭 61 - 265297	(71) 出願人	999999999 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号
(22) 出願日	昭和 61 年 (1986) 11 月 7 日	(72) 発明者	勝亦 謙一 東京都町田市成瀬 2 - 12 - 3 ポプラ 丘コープ 6 - 401
(65) 公開番号	特開昭 63 - 119688	(72) 発明者	横井 治彦 東京都町田市成瀬台 2 - 32 - 4 ポプ ラヶ丘コープ 21 - 205
(43) 公開日	昭和 63 年 (1988) 5 月 24 日	(72) 発明者	木野 邦器 東京都町田市旭町 1 - 6 - 16
微生物の受託番号	FERM BP - 1161	審査官	種村 慈樹
微生物の受託番号	FERM BP - 1162		

(54) 【発明の名称】 L - グルタミン酸および L - プロリンの製造法

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 微生物のクエン酸シンターゼの合成に関与する遺伝情報を担う DNA 断片とベクター DNA との組換え体 DNA を保有するコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属に属する微生物を培地に培養し、培養物中に L - グルタミン酸または L - プロリンを生成蓄積させ、該培養物から該アミノ酸を採取することを特徴とする L - グルタミン酸および L - プロリンの製造法。

【請求項 2】 該 DNA 断片がエシェリヒア属、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属またはバチルス属に属する微生物に由来することを特徴とする特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 3】 該ベクターがコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属細菌中で自律複製できるものから選ばれる特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 4】 組換え体 DNA を保有する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミクム K70 (FERM BP - 1161) またはコリネバクテリウム・グルタミクム K71 (FERM BP - 1162) である特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 産業上の利用分野

本発明は、微生物のクエン酸シンターゼ (以下 CS と略す) の合成に関与する遺伝情報を担う DNA 断片とベクター DNA との組換え体 DNA をコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属に属する微生物に保有させ、該微生物を培地に培養し、培養物中に L - グルタミン酸または L - プロリンを生成蓄積させ、該培養物から該アミノ酸を採取することを特徴とする L - グルタミン酸および L - プロリンの製造法に関する。したがって、本発明はバイオインダストリーの産業分野に関し、とくに食品工業

において有用な $\gamma$ -グルタミン酸、または医薬として有用な $\gamma$ -プロリンの製造分野に関する。

#### 従来の技術

コリネバクテリウム属やブレビバクテリウム属などに属する微生物を用いる発酵法による $\gamma$ -グルタミン酸の製造法については、該属菌種の野生株を用いる方法の他、野生株から誘導されたオレイニン酸などに対する栄養要求性変異株（特公昭50-19632、特開昭59-102193）、リゾチーム感受性変異株（特開昭54-122794）、温度感受性変異株（特公昭58-32595）、フロロビルビン酸感受性変異株（特公昭57-21313）、あるいは種々の物質に耐性を有する変異株（特開昭50-89590、特開昭56-164792、特開昭60-88990）などを用いる方法が知られている。

また、コリネバクテリウム属やブレビバクテリウム属菌株を用いる発酵法による $\gamma$ -プロリンの製造法については、該属菌種の野生株を特定の培養条件のもとで培養する方法（発酵と工業、40, 15（1982））の他、野生株から誘導されたイソロイシンなどに対する栄養要求株（ジャーナル・オブ・ジェネラル・アプライド・ミクロバイオロジー（J. Gen. Appl. Microbiol.）, 15, 387（1969））、プロリンアナログ耐性株（アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリイ（Agric. Biol. Chem.）, 46, 487（1982））、プリンアナログまたはピリジンアナログ耐性株（特開昭59-109188）などの変異株を用いる方法が知られている。

一方、組換えDNA技法により育種された菌株を用いる $\gamma$ -グルタミン酸または $\gamma$ -プロリンの製造法も知られている。例えばホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む組換え体DNAを保有する菌株を用いて $\gamma$ -グルタミン酸を発酵生産する方法（特開昭58-126789）や、 $\gamma$ -グルタミン酸から $\gamma$ -プロリンへの生合成に関与する遺伝子を含む組換え体DNAを保有する菌株を用いて $\gamma$ -プロリンを発酵生産する方法（特開昭60-78591）などが知られている。

#### 発明が解決しようとする問題点

食品添加物として有用な $\gamma$ -グルタミン酸は大量の需要があり、また近年医薬あるいは医薬原料として $\gamma$ -プロリンの需要も増大しており、これらのアミノ酸の製造法の改良は常に望まれている。

#### 問題点を解決するための手段

グルタミン酸の生合成に関与する諸酵素のうち、CSはオキザロ酢酸とアセチルCoAからクエン酸を合成する酵素であり、微生物におけるエネルギー産生および生体成分の中間体の供給に重要な役割を担うクエン酸回路の第1酵素である。

本発明者は、このCSの増幅による効果を検討したところ、微生物のCSの合成に関与する遺伝子（以下CS遺伝子と称することもある）を含む組換え体DNAを $\gamma$ -グルタミン酸または $\gamma$ -プロリン生産菌に導入すれば、より高収

率で $\gamma$ -グルタミン酸または $\gamma$ -グルタミン酸を前駆体として合成される $\gamma$ -プロリンが製造できることを見出し、本発明を完成した。CSの合成に関与する遺伝子を含む組換え体DNAの導入が $\gamma$ -グルタミン酸または $\gamma$ -プロリンの生産性に寄与することは、本発明者により初めて見出されたものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明によれば、微生物のCSの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有するコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養し、微生物中に $\gamma$ -グルタミン酸または $\gamma$ -プロリンを生成蓄積させ、該培養物から該アミノ酸を採取することにより、より高収率で $\gamma$ -グルタミン酸および $\gamma$ -プロリンを製造することができ

る。  
宿主微生物として用いるコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物としては、いわゆるコリネ型グルタミン酸生産菌として知られる微生物は全て用いることができるが、好適には下記の菌株が用いられる。

コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC 31833
コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム	ATCC 13870
コリネバクテリウム・ハーキュリス	ATCC 13868
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
ブレビバクテリウム・ディバリカツム	ATCC 14020
ブレビバクテリウム・フラブム	ATCC 14067
ブレビバクテリウム・イマリオフィラム	ATCC 14068
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム	ATCC 13869
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC 19240

上記のようなコリネ型グルタミン酸生産菌の野生株のほか $\gamma$ -グルタミン酸生産の場合には、オレイニン酸などに対する栄養要求性やリゾチーム感受性、温度感受性、フロロビルビン酸感受性、さらには種々の物質に対する耐性が付与された菌株も用いることができる。また $\gamma$ -プロリン生産の場合には、イソロイシンなどに対する栄養要求性、プロリンアナログ耐性、プリンアナログまたはピリミジンアナログ耐性などが付与された菌株も用いることができる。

本発明におけるCSの合成に関与する遺伝子の供給源となる微生物としては、CS活性を有する微生物ならばいかなる微生物でもよい。なかでも原核生物である細菌、たとえばエシェリヒア属、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属またはバチルス属に属する菌株が好ましい。具体的に好適な例としては、大腸菌（エシェリヒア・コリ）、コリネバクテリウム・グルタミクムおよび枯草菌（バチルス・ズブチリス）などがあげられる。CS遺伝子は、上記のような菌株の染色体DNAより得ることができる。

該DNAを組み込むためのベクターとしては、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種中で自律複

製できるものであれば特に限定されないが、例えばpCG1 (特開昭57-134500)、pCG2 (特開昭58-35197)、pCG4、pCG11 (いずれも特開昭57-183799)、pCE54、pCB101 (いずれも特開昭58-105999)、pCE51 (特開昭60-34197)、pCE52、pCE53 (いずれもモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Mol. Gen. Genet.) 196, 175 (1984))、およびそれらから誘導されたプラスミドを使用することができる。

CSをコードする遺伝子を含む供与体DNAとベクターDNAとの組換え体DNAは、試験管内で両DNAを制限酵素で切断後、DNAリガーゼで処理するか、またはその切断末端をターミナルトランスフェラーゼやDNAポリメラーゼなどで処理した後、DNAリガーゼを作用させて結合する常法 [メソツ・イン・エンチモロジ (Methods in Enzymology) 63, (1979)] により種々の組換え体混成物とともに生成させることができる。この混成物を用いて、L-グルタミン酸要求性菌株として取得されるコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属のCS遺伝子欠損変異株を形質転換し、L-グルタミン酸要求性が非要求性に回復した形質転換株を選択し、この形質転換株の有するプラスミドを単離することによって、CSをコードする遺伝子を含む組換え体DNAを取得できる。

コリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属菌株で直接組換え体DNAを選択する代わりに、例えば大腸菌のように既に遺伝子組換え技術が確立している宿主-ベクター系を用いることもできる。すなわち、供与体DNAとベクターDNAの試験管内結合反応物を用いCSをコードする遺伝子が欠損したL-グルタミン酸要求性の大腸菌変異株を形質転換し、欠損形質が相補された形質転換株を選択する。この形質転換株からクローン化したDNAとコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属微生物のベクターDNAとを取り出し、これを試験管内で制限酵素で切断した後、DNAリガーゼで再結合反応させる。この反応物を用いてCSをコードする遺伝子の欠損したコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属の変異株を形質転換し、欠損形質が相補された形質転換株を選択する。この手段によっても同様に目的の組換え体DNAを取得できる。

また、大腸菌とコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属菌種との両者において複製可能なシャトルベクターを用いれば、CSをコードする遺伝子が欠損した大腸菌の変異株を用いて上記のようにしてCS遺伝子をクローン化し、直接、目的の組換え体DNAを取得できる。

CS遺伝子を含む組換え体DNAを保有する形質転換株として具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC 31833に大腸菌のCS遺伝子を含む組換え体プラスミドpBg11A-2を保有させたコリネバクテリウム・グルタミカムK70 (FERM BP-1161)、およびコリネバクテリウム・グルタミカムATCC31833にコリネバクテリウム・グルタミカムのCS遺伝子を含む組換え体プラスミドpCG11A-

1を保有させたコリネバクテリウム・グルタミカムK71 (FERM BP-1162) があげられる。これらの菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所 (微工研) に昭和61年8月29日付で寄託されている。

CS遺伝子を含む組換え体DNAを保有する形質転換株によるL-グルタミン酸の生産は、従来知られているように、培地中のバイオチン含量を低く抑えて培養するか、バイオチン含量の高い培地の場合にはペニシリンのような抗生物質 (特公昭37-1695) や界面活性剤 (特公昭40-8798, 特公昭40-14559) などを加えて培養することにより行われる。またオレイン酸要求株やグリセロール要求株などの栄養要求性が付与された変異株を宿主とした形質転換株では、これら要求物質の量を制限して培養することで (特公昭53-6233, 特公昭53-28519)、温度感受性変異株を宿主とした形質転換株では培養途中で培養温度を高めることで (特公昭58-32595) L-グルタミン酸生産が行われる。

また形質転換株によりL-プロリンの生産は、従来の発酵法によるL-プロリンの製造に用いられる方法により行うことができる。すなわち、該形質転換株を炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地中、好氣的条件下、温度、pHなどを調節しつつ培養を行えば、培養物中にL-プロリンが生成蓄積するのでこれを採取する。菌株によっては培養中の塩化アンモニウム濃度を高めたり、アルコールを培養途中で添加するなどの操作により、さらに高収率でL-プロリンを生成させることができる [発酵と工業, 40, 15 (1982)]。

培地中の炭素源としてはグルコース、グリセロール、フラクトース、シュークロース、マルトース、マンノース、澱粉、澱粉加水分解物、糖蜜などの種々の炭水化物、ポリアルコール、ビルビン酸、フマル酸、乳酸、酢酸などの各種有機酸が使用できる。さらに菌の炭化性によって、炭化水素、アルコール類なども用いる。とくに蔗糖蜜は好適に用いられる。

窒素源としてはアンモニアあるいは塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類あるいは尿素および他の窒素含有物質ならびにペプトン、YZ-アミン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチープ・リカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物、脱脂大豆粕あるいはその消化物、蛹加水分解物などの窒素含有有機物など種々のものが使用可能である。

さらに無機物としては、リン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンおよび炭酸カルシウムなどを使用する。微生物の生育に必要とするビタミン、アミノ酸源などは、前記したような他の培地成分に従って培地に供給

されれば特に加えなくてもよい。ただしL-プロリン生産の場合、培地にL-グルタミン酸塩、D-, L-およびDL-ピロリドンカルボン酸を添加すれば、収率はさらに向上する。

培養は振盪培養あるいは通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は一般に20~40℃が好適である。培養中の培地のpHは中性付近に維持することが望ましい。培養期間は通常1~5日間で培地中にL-グルタミン酸またはL-プロリンが蓄積する。

培養終了後、菌体を除去して活性炭処理、イオン交換樹脂処理などの公知の方法で培養液からL-グルタミン酸またはL-プロリンを回収する。

本発明の有用性は、微生物のCSの合成に関与する遺伝子とコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属菌種のベクターDNAとを形質発現できる形で組み換えた組換え体DNAをコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属菌種に導入すれば、該菌株のL-グルタミン酸またはL-プロリンの生産性を強化できる点にある。本明細書では大腸菌、コリネバクテリウム・グルタミカムおよび枯草菌のCS遺伝子を用いる例を示したが、代わりに他の微生物のCS遺伝子を用いても目的が達成される。それゆえ、CS遺伝子は本明細書で例示した大腸菌、コリネバクテリウム・グルタミカムおよび枯草菌のCS遺伝子に限定されるものではない。またベクタープラスミドは組換え体として連結されたCS遺伝子を安定に遺伝させるために、その自律複製能を提供しているにすぎない。従って、本明細書に例示したpCG11およびpCB61に限らず、コリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属菌種中で自律複製できるプラスミドはすべて使用できる。

グルタミン酸高生産性を有するいわゆるコリネ型グルタミン酸生産菌は、主な菌学的性質を同じくしているにもかかわらず、産業上の重要性から、各研究者により、種々の菌名が付されており、属名までも、コリネバクテリウム属あるいはプレバクテリウム属など種々である。しかしながら、これらの菌群は、細胞のアミノ酸構成やDNAの塩基組成が画一的であることから、同一の菌種であることが指摘されていた。さらに、最近、これらの菌種間には、70~80%以上のDNAの相同性があることが明らかにされ、非常に近縁な微生物であることが明白である [Komatsu, Y.: レポート・オブ・ザ・ファーマンティティブ・リサーチ・インスティテュート (Report of the Fermentative Research Institute), No. 55, 1 (1980) および Suzuki, K., Kaneko, T. and Komagata, K.: インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Int. J. Syst. Bacteriol.), 31, 131 (1981) 参照]。

本明細書では、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 31833、コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869 およびコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032よ

り誘導されたプロリン生産菌コリネバクテリウム・グルタミカム H-3334 (FERM P-6823) にCS遺伝子を含む組換え体DNAを導入し、その遺伝子の形質発現に基づくL-グルタミン酸またはL-プロリンの生産性の向上について例示したが、上記の事実を踏まえればコリネ型グルタミン酸生産菌全般での効果が容易に類推される。その効果の有無は組換え体DNAがコリネ型グルタミン酸生産菌全般で自律的に複製し、CS遺伝子が形質発現できるか否かに係わり、コリネ型グルタミン酸生産菌間のDNA相同性などにおける若干の相違は何ら関係ない。しかるにこれらの菌種がプラスミドの複製と遺伝子発現に係わる機能を等しく保持していることは、特開昭57-518379に開示されたコリネバクテリウム・グルタミカム 225-250株から分離され、スペクテノマイシンおよび/またはストレプトマイシン耐性遺伝子を有するプラスミド pCG4がコリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属菌種などのコリネ型グルタミン酸生産菌内で同じく複製でき、またその耐性遺伝子が発現される (特開昭57-186492) ことから明らかである。従って本発明のCS遺伝子を含む組換え体DNAを導入することによるL-グルタミン酸またはL-プロリン生産菌の作製法を適用しうる菌種は、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・ハーキュリスおよびプレバクテリウム・ラクトファーマンタムに限らず、コリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属などのコリネ型グルタミン酸生産菌全てが含まれる。

以下に本発明の実施例を示す。

#### 実施例

(1) 宿主特異的制限欠損変異とCS遺伝子欠損変異をあわせ持つ大腸菌変異株の取得:

大腸菌の宿主-ベクター系を用いて大腸菌以外の微生物のCS遺伝子をより容易にクローン化するために、宿主菌として宿主特異的制限欠損変異 (hsdR<sup>-</sup>) とCS遺伝子欠損変異 (glia<sup>-</sup>) とをあわせ持つ大腸菌 K12株亜株を以下のようにして取得した。

宿主特異的制限欠損変異 (hsdR<sup>-</sup>) を有する大腸菌 K12株亜株 WA802 (メニオン要求性: FERM BP-718) に N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 100 μg/ml を用い 37℃、30分間通常の変異処理 (エックスペリメント・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Experiment in Molecular Genetics) p125, コールドスプリング ハーバー ラボラトリー (1972)) を施した後、ペニシリンを用いる栄養要求株の濃縮法 (エックスペリメント・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Experiment in Molecular Genetics) p230, コールドスプリング ハーバー ラボラトリー (1972)) に従ってグルタミン酸要求株を濃縮後、選択した。得られたグルタミン酸要求株のなかからCS遺伝子の欠損変異株を選択するために、各グルタミン酸要求株についてそのCS活性を測定した。測定はGuestの方法 [ジャーナル・オ

ブ・ジェネラル・ミクロバイオロジイ (J. Gen. Microbiol.) 124, 17 (1981) に従って行った。その結果、CS欠損変異株としてEG22株を取得した。

## (2) 大腸菌のCS遺伝子のクローニング:

クローニングは大腸菌の宿主-ベクター系にて実施した。ベクターとして使用したpBR322 (アンピシリン耐性、テトラサイクリン耐性) は宝酒造社製の市販品を用いた。大腸菌のCS遺伝子を含む染色体DNAは、大腸菌K12株垂株WA802 (FERM BP-718) より常法 [バイオキミカ・エ・

バイオフィジカ・アクタ (Biochem. Biophys. Acta), 72, 619 (1963)] により単離した。pBR322プラスミドDNA 1  $\mu$ g およびWA802株の染色体DNA 3  $\mu$ g を含む制限酵素反応液A [10mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (以下トリスと略す), 100mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5] 100  $\mu$ l に10単位のHind III (宝酒造社製、以下特記しない限り制限酵素は宝酒造社製) および10単位のEcoR I を添加し、37℃で6分間反応後、65℃で40分間加温し反応を停止した。該反応消化物に10倍濃度のT4リガーゼ緩衝液 (660mM トリス, 66mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM ジチオスレイトール, pH7.6) 11  $\mu$ l, 100 mM ATP 1  $\mu$ l およびT4リガーゼ (宝酒造社製: 350単位/  $\mu$ l, 以下特記しない限りT4リガーゼは宝酒造社製) 200単位を加え、12℃で24時間反応させた。このリガーゼ反応混合物を(1)で取得したCS欠損変異を有する大腸菌K12株垂株EG22 (メチオニンおよびグルタミン酸要求性) の形質転換に供した。

EG22株のコンピテントセルは、ダジェルトらの方法 [ジーン (Gene), 6, 23 (1979)] で調製した。即ち、L 培地 (バクトトリプトン10g, 酵母エキス5g, グルコース1g およびNaCl 5g を水1 l に含み, pH7.2に調整した培地) 50ml にEG22株を植菌し、東京光電比色計で660nmにおける吸光度 (OD) (以下特記しない限りODは660nmで測定) が0.5になるまで37℃で培養した。培養液を氷水中で10分間冷却してから遠心した。冷却した0.1M CaCl<sub>2</sub> 20ml に菌体を再懸濁し、0℃で20分間置いた。菌体を再遠心し、0.1M CaCl<sub>2</sub> 0.5ml に懸濁し、0℃で18時間置いた。CaCl<sub>2</sub> 処理した菌液150  $\mu$ l に前記リガーゼ反応混合物50  $\mu$ l を添加混合し、0℃に10分間置いてから37℃で5分間加温した。ついでL 培地2ml を添加し37℃で2時間振盪培養した。生理食塩水で2回遠心分離洗浄後、30  $\mu$ g/ml のメチオニンおよび50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含むデービス最少寒天培地 [グルコース2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1g, クエン酸三ナトリウム塩0.5g, サイアミン塩酸塩4mg および寒天15g を水1 l に含み, pH7.2に調整した培地] に塗布し、37℃で3日間培養した。出現した形質転換株の1株からアンらの方法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジイ (J. Bacteriol.), 140, 400 (1979)] に従って単離したプラスミドは、Hind III とEcoR I による消化とアガロースゲル電気泳動による解析の結果、pBR322のHi

nd III 切断部位とEcoR I 切断部位の間にWA802株の染色体DNAに由来する3.2キロベースのHind III-EcoR I 断片が挿入されていた (第1図参照)。このプラスミドをpBg11A-1と命名した。またpBg11A-1を用いてEG22株を前記と同様にして形質転換し、アンピシリン耐性で選択された形質転換株は全てグルタミン酸非要求性を示し、それから単離されたプラスミドはpBg11A-1と同一の構造を有していた。

以上の結果から、大腸菌K12株に由来するCS遺伝子がpBg11A-1上にクローニングされていることが明らかになった。

## (3) プラスミドpBg11A-2の作製:

(2)で得られたpBg11A-1をコリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属のベクタープラスミドpCG11と組み換え、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属およびエシェリヒア属菌種で複製可能なシャトルプラスミドpBg11A-2を作製した。pCG11は、コリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属のプラスミドベクターで、ストレプトマイシンおよび/またはスペクチノマイシン耐性遺伝子を有する。

pBg11A-2の作製は以下の工程により行った。

pCG11はそれを保有するコリネバクテリウム・グルタミクム LA103/pCG11 (ATCC 39022) から特開昭57-134500に記載された方法に従って単離した。即ち該菌株を400ml, NB培地 (粉末ブイヨン20g, 酵母エキス5g を水1 l に含みpH7.2に調整した培地) でODが約0.8になるまで生育させた。培養液から菌体を集菌し、TES緩衝液 [トリス 0.03M, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (BDT A) 0.005M, NaCl 0.05M, pH8.0] で洗浄後、リゾチーム溶液 (25% ショ糖, 0.1M NaCl, 0.05M トリス, 0.8 mg/ml リゾチーム, pH8.0) 10ml に懸濁し、37℃で4時間反応させた。反応液に5M NaCl 2.4ml, 0.5M EDTA (pH8.0) 0.6ml, および4% ラウリル硫酸ナトリウムと0.7M NaCl からなる溶液4.4ml を順次添加し、緩やかに混和してから氷水中に15時間置いた。溶解物全量を遠心管に移し、4℃で60分間、69,400  $\times$  g の遠心分離にかけ上澄液を回収した。これに重量百分率10%相当のポリエチレングリコール (PEG) 6,000 (半井化学薬品社製) を加え、静かに混和して溶解後、氷水中に置いた。10時間後、1,500  $\times$  g で10分間遠心分離してペレットを回収した。TES緩衝液5mlを加えてペレットを静かに再溶解してから1.5mg/ml エチジウムブロマイド2.0mlを添加し、これに塩化セシウムを加えて静かに溶解し、密度を1.580に合わせた。この溶液を105,000  $\times$  g, 18℃で48時間遠心分離にかけた。この密度勾配遠心により共有結合で閉じられた環状のDNAは、紫外線照射することによって遠心チューブ中下方の密度の高いバンドとして見出された。このバンドを注射器で遠心チューブの側面から抜きとることによってプラスミドpCG11を分離した。ついで分離液を等容量のイソプロピルアルコール液 (容量百分

率90%イソプロピルアルコール、10%TES緩衝液（この混液中に飽和溶解量の塩化セシウムを含む）で5回処細してエチジウムブロマイドを抽出除去し、しかる後にTES緩衝液に対して透析し、pCG11プラスミドDNAを得た。

以上のようにして調製したpCG11 DNA  $1 \mu\text{g}$  および pBglIA-1 DNA  $1 \mu\text{g}$  を含む制限酵素Pst I（用反応液（20mM トリス、50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、10mM MgCl<sub>2</sub>、pH7.5）100  $\mu\text{L}$  に10単位のPst Iを添加し、37℃で60分間反応後、65℃で40分間加温して反応を停止した。該反応混合物に10倍濃度のT4リガーゼ緩衝液11  $\mu\text{L}$ 、100mM ATP 1  $\mu\text{L}$  およびT4リガーゼ200単位を加え、12℃で24時間反応させた。該リガーゼ反応混合物を用い、大腸菌K12株並株BG22を

（2）と同様な方法で形質転換し、スペクチノマイシン100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む寒天培地（L培地に1.5%の寒天を加えた培地）上に塗布し、30℃で2日間培養した。この寒天平板上に出現したスペクチノマイシン耐性を獲得した形質転換株の1株より（2）と同様にしてプラスミドDNAを単離した。このプラスミドDNAの構造を制限酵素切断とアガロースゲル電気泳動により解析したところ、このプラスミドはpCG11のPst I切断部位とpBglIA-1のPst I切断部位とが互いに結合した構造を有していた（第1図参照）。このプラスミドをpBglIA-2と命名した。pBglIA-2を用いてBG22株を形質転換したところ、スペクチノマイシン耐性を獲得した形質転換株は同時にグルタミン酸非要求性も有していた。

以上の結果より、pBglIA-2は大腸菌K12株のCS遺伝子を含み、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属およびエシェリヒア属菌種で複製可能なプラスミドであることが明らかになった。

（4）コリネバクテリウム・グルタミクムのCS遺伝子のクローン化：

クローン化は大腸菌の宿主-ベクター系にて実施した。宿主として、（1）で取得した宿主特異的制限欠損変異とCS欠損変異をあわせ持つ大腸菌K12株並株BG22（グルタミン酸メチオニン要求性）を用いた。またベクターとして、大腸菌とコリネバクテリウム属またはブレヴィバクテリウム属菌種双方で複製可能で、カナマイシン耐性遺伝子とスペクチノマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドpCE61を用いた。pCE61は、pCG11（特開昭57-183799）とpCE54（特開昭58-105999）から以下の工程により作製した。

pCG11は（3）と同様の方法により、またpCE54はそれを保有するコリネバクテリウム・グルタミクムLA103/pCE54（ATCC39019）株よりpCG11を調製したのと同様の方法によりそれぞれ調製した。pCG11はpCG1とpCG4とを組み換えて作製されたプラスミドで、薬剤耐性マーカーとしてスペクチノマイシンまたはストレプトマイシン耐性遺伝子を有している（特開昭57-183799）。またpCE54は、pCG2と大腸菌のベクターpGA22（ジャーナル・オブ

・バクテリオロジイ（J. Bacteriol.）、140, 400（1979））とを組み換えて作製されたプラスミドで、薬剤耐性マーカーとしてカナマイシン耐性、クロラムフェニコール耐性、テトラサイクリン耐性の各遺伝子を有している（特開昭58-105999）。

pCG11 DNA  $1 \mu\text{g}$  または pCE54 DNA  $2 \mu\text{g}$  を含む制限酵素反応液A50  $\mu\text{g}$  に各々10単位のBgl II、BamHIを添加し、37℃で1時間反応させた。該消化物を65℃で40分間加温した後混合し、10倍濃度のT4リガーゼ緩衝液6  $\mu\text{L}$ 、100mM ATP 1  $\mu\text{L}$  およびT4リガーゼ100単位を添加し、12℃で24時間反応させた。

形質転換は、大腸菌K12株並株WA802（メチオニン要求性、FERM BP-718）を用いて（2）と同様の方法にて実施した。形質転換株の選択には100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  スペクチノマイシン、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  カナマイシンを含むL寒天培地を用いた。出現した形質転換のうちの1株から（2）と同様の方法で単離したプラスミドDNAは、制限酵素消化とアガロースゲル電気泳動で解析した結果、pCE54のカナマイシン耐性遺伝子および大腸菌内での複製開始点のうちの1つ（ジャーナル・オブ・バクテリオロジイ（J. Bacteriol.）、140, 400（1979））を含む2.7キロベースのBamHI断片が、pCG11のBgl II切断部に挿入された構造を有するものであることが示された（第2図参照）。このプラスミドをpCE61と命名した。

供与体DNAとなる染色体DNAは、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833から、特開昭58-125789に記載された方法に従って単離した。すなわち400mlのSSM培地（グルコース10g、NH<sub>4</sub>Cl 4g、尿素2g、酵母エキス1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3g、MgCl<sub>2</sub> · 8H<sub>2</sub>O 0.4g、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10mg、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 0.2mg、ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.9mg、CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.4mg、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O 0.09mg、（NH<sub>4</sub>）<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.04mg、ビオチン30  $\mu\text{g}$ 、サイアミン塩酸塩1mgを純水1  $\mu\text{L}$  に含みpH7.2に調整した培地）に種培養を接種して30℃で振盪培養した。ODが0.2になった時点で培養液に0.5単位/mlの濃度となるようにペニシリンGを添加した。さらに培養を継続し、ODが0.8になるまで生育させた。

培養液から菌体を集菌し、TES緩衝液で洗浄後、リゾチーム溶液10mlに懸濁し37℃で4時間反応させた。集菌した菌体から斎藤らの方法（バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ（Biochem. Biophys. Acta）、72, 619（1983））に従って高分子染色体DNAを単離した。

以上のようにして調製したコリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833染色体DNAを供与体DNAとして、またpCE61をベクターとしてコリネバクテリウム・グルタミクムのCS遺伝子をクローン化した。

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833株の染色体DNA3  $\mu\text{g}$  およびpCE61プラスミドDNA2  $\mu\text{g}$  を含む制限酵素Pst I（用反応緩衝液100  $\mu\text{L}$  に10単位のPst Iを添加し、37℃で1時間反応させた。該消化物を65℃で40分間



加温した後、10倍濃度のT4リガーゼ緩衝液11 $\mu$ g、100mM ATP 1 $\mu$ gおよびT4リガーゼ200単位を添加し、12℃で24時間反応させた。該リガーゼ反応物を用いてEG22株を(2)と同様な方法で形質転換し、メチオニン30 $\mu$ g/mlおよびカナマイシン20 $\mu$ g/mlを含むデビス最少寒天培地に塗布し、30℃で3日間培養した。出現したカナマイシン耐性かつグルタミン酸非要求性の形質転換株のうちの1株から(2)と同様な方法でプラスミドを単離した。このプラスミドDNAは制限酵素消化とアガロースゲル電気泳動で解析した結果、第2図に示されるようにpCE61のPst I切断部位に約3.6キロベースのDNA断片が挿入された構造を有していることが示された。このプラスミドをpCglIA-1と命名した。pCglIA-1を用いてEG22株を前記の方法で形質転換した結果、カナマイシン耐性を獲得した形質転換株は全てグルタミン酸非要求性を示した。

以上の結果より、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833株に由来のCS遺伝子がpCglIA-1上にクローニングされていることが明らかになった。

#### (5) 枯草菌のCS遺伝子のクローニング:

クローニングは大腸菌の宿主-ベクター系にて実施した。宿主としてEG22株を、ベクターとしてpBR322を用いた。供与体DNAとなる枯草菌の染色体DNAは、枯草菌マーマーグ株ATCC6051よりバイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ (Biochem. Biophys. Acta), 12, 619 (1963)に記載の方法に従い単離した。

pBR322プラスミドDNA 1 $\mu$ gおよび枯草菌ATCC6051染色体DNA 3 $\mu$ gを含む制限酵素反応液A100 $\mu$ gに10単位のBcoR Iを添加し、37℃で60分間反応後、65℃で40分間加温して反応を停止した。該反応消化物に10倍濃度のT4リガーゼ緩衝液11 $\mu$ g、100mM ATP 1 $\mu$ gおよびT4リガーゼ200単位を加え、12℃で24時間反応させた。このリガーゼ反応混合物をEG22株の形質転換に供した。形質転換は(2)と同様な方法で行った。形質転換株の選択にはメチオニン30 $\mu$ g/mlおよびアンピシリン50 $\mu$ g/mlを含むデビス最少寒天培地を用いた。出現したアンピシリン耐性かつグルタミン酸非要求性の形質転換株のうちの1株から、(2)と同様な方法でプラスミドを単離した。このプラスミドDNAは制限酵素消化とアガロースゲル電気泳動で解析した結果、第3図に示されるようにpBR322のEcoR I切断部位に約3キロベースのDNA断片が挿入された構造を有していることが示された。このプラスミドをpBglIA-1と命名した。またこのプラスミドを用いてEG22株を前記と同様に形質転換した結果、アンピシリン耐性を獲得した形質転換株は全てグルタミン酸非要求性を示した。以上の結果より、枯草菌ATCC6051のCS遺伝子がpBglIA-1上にクローニングされていることが明らかになった。

#### (6) プラスミドpBglIA-2の作製:

(5)で得られたpBglIA-1をコリネバクテリウム属お

よびプレバクテリウム属のベクタープラスミドpCG11と組み換え、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属およびエシェリヒア属菌種で複製可能なシャトルプラスミドpBglIA-2を以下の工程で作製した。

(3)と同様な方法で単離したpCG11 DNA1 $\mu$ gを含む制限酵素反応液A50 $\mu$ gに4単位のBgl IIを添加し、37℃で60分間反応後65℃で40分間加温して反応を停止した。一方pBglIA-1 DNA 1 $\mu$ gを含む制限酵素反応液A50 $\mu$ gに4単位のBamH Iを添加し、37℃で60分間反応後65℃で40分間加温して反応を停止した。

両消化反応物を混合し、10倍濃度のT4リガーゼ緩衝液11 $\mu$ g、100mM ATP1 $\mu$ gおよびT4リガーゼ100単位を加え、12℃で24時間反応させた。このリガーゼ反応混合物をEG22株の形質転換に供した。形質転換は(2)と同様な方法で行った。形質転換株の選択にはスペクテノマイシン100 $\mu$ g/mlを含むL寒天培地を用いた。出現したスペクテノマイシン耐性を獲得した形質転換株のうちの1株から(2)と同様な方法に従いプラスミドを単離した。このプラスミドは制限酵素消化とアガロースゲル電気泳動で解析した結果、pCG11のBgl II切断部位とpBglIA-1のBamH I切断部位とが互いに結合した構造を有していることが示された(第3図参照)。このプラスミドをpBglIA-2と命名した。またこのプラスミドを用いてEG22株を形質転換したところ、スペクテノマイシン耐性を獲得した形質転換株では全てグルタミン酸非要求性を示した。以上の結果より、pBglIA-2は枯草菌ATCC6051のCS遺伝子を含み、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属およびエシェリヒア属菌種で複製可能なプラスミドであることが示された。

(7) pBglIA-2、pCglIA-1、pBglIA-2による形質転換:

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868およびプレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869のプロトプラストを下記の方法に従って形質転換して、pBglIA-2またはpCglIA-1を導入した。また、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032から誘導されたプロリン生産菌コリネバクテリウム・グルタミクムH-3334 (FERM P-8823、特開昭59-109188参照)のプロトプラストを同様に形質転換してpBglIA-2を導入した。

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868およびプレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869をそれぞれNB培地に30℃で16時間振盪培養した。その培養液0.1mlを10mlのSSM培地の入ったL字型試験管に接種し、モノ型培養槽にて30℃で振盪培養した。ODが0.15倍になった時点で0.5単位/mlになるようにペニシリンGを添加した。さらに培養を続け、ODが約0.6になったところで集菌し、RCGP培地(グルコース5g、カザミノ酸5g、酵母エキス85g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>3.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1.5g、MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 0.

(8)

特公平7-121228

15

41g,  $\text{SeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  2mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.9mg,  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.04mg, ビオチン30 $\mu\text{g}$ , サイアミン塩酸塩 2mg, コハク酸二ナトリウム135g, ポリビニルピロリドン(分子量10,000) 30gを水1gに含む培地に1mg/mlのリゾチームを加えた液(pH7.6) 2mlに懸濁し、L字型試験管に移して30℃で14時間緩やかに振盪してプロトプラスト化した。このプロトプラスト菌液1mlを小試験管にとり2,500 $\times$ gで15分間遠心分離した。沈殿物をTSMC緩衝液(10mM  $\text{MgCl}_2$ , 30mM  $\text{CaCl}_2$ , 50mM トリス, 400mM ショ糖, pH7.5) 1mlに懸濁して遠心洗浄後、TSMC緩衝液0.1mlを加えて再懸濁した。これに2倍濃度のTSMC緩衝液とpEgIIA-2またはpCgIIA-1DNAの1対1混合液100 $\mu\text{g}$ を加えて混和し、ついでTSMC緩衝液中に20%PEG8,000を含む液1.0mlを添加して混合した。3分後、2,500 $\times$ gで5分間遠心分離にかけて上澄液を除去し、沈降したプロトプラストを1mlのRCGP培地(pH7.4)に懸濁してから30℃で2時間緩やかに振盪した。ついでこのプロトプラスト懸濁液の0.3mlをスペクテノマイシン400 $\mu\text{g}$ /mlを含むRCGP寒天培地(RCGP培地に1.6%寒天を含む培地, pH7.4)に塗布し、30℃で10日間培養した。

出現したスペクテノマイシン耐性形質転換株を400mISSM培地で振盪培養し、ODが0.15になったところで0.5単位/mlとなるようにペニシリンGを添加し、さらにODが0.68になるまで培養し、集菌した菌体から(3)に示したpCgIIの単離法と同様な方法でプラスミドを単離した。これらのプラスミドを制限酵素消化とアガロースゲル電気泳動で解析した結果、各種制限酵素切断様式で特徴付けられるpEgIIA-2またはpCgIIA-1と同一の構造を有するものであることがわかった。以上のようにしてコリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868およびプレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869にpEgIIA-2またはpCgIIA-1を導入した。

また同様の操作により、コリネバクテリウム・グルタミクムH-3334(PERM P-6823)株にpBglIA-2を導入した。

このような形質転換株がコリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833/pEgIIA-2、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833/pCgIIA-1、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868/pEgIIA-2、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868/pCgIIA-1、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869/pEgIIA-2、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869/pCgIIA-1およびコリネバクテリウム・グルタミクムH-3334/pBglIA-2である。このうちコリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833/pEgIIA-2はコリネバクテリウム・グルタミクムK70(PERM BP-1161)として、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833/pCgIIA-1はコリネバウテリウム・グルタミクムK71(PERM BP

10

20

30

40

50

-1161)として農工研に寄託されている。

(8) L-グルタミン酸の生産試験:

(7)で得られたpBglIA-2またはpCgIIA-1を保有する形質転換株のL-グルタミン酸生産試験を下記の方法に従って行った。

(a) 種培地として、グルコース4%、ポリペプトン2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、ビオチン10 $\mu\text{g}$ /l、尿素0.3%、pH7.2の組成で120℃で10分間殺菌したものを用いた。形質転換株を該種培地にて30℃、24時間振盪培養し、その4mlを300ml容三角フラスコ中の生産培地A〔グルコース6%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2mg/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10mg/l、サイアミン塩酸塩1mg/l、尿素0.5%、フェノールレッド10mg/l (pH6.5, 120℃、20分殺菌)〕20mlに接種して30℃で培養を行った。培養中培養液をpH6.0~8.0に保つため12時間と20時間目の2回、10%尿溶液を1mlずつ添加して30時間振盪培養した。

培養後、培養液をペーパークロマトグラフィーにかけ、ニンヒドリン発色後、比定量してL-グルタミン酸の生成量を測定した。

培養液中に蓄積したL-グルタミン酸生成量は、第1表に示した通りである。

第 1 表

菌株	L-グルタミン酸 (mg/ml)
コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833	29.8
コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833/pEgIIA-2(K70, FERM BP-1161)	31.2
コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833/pCgIIA-1(K71, FERM BP-1162)	32.3
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868	25.6
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868/pEgIIA-2	27.9
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868/pCgIIA-1	28.6
プレバクテリウム・ラクトファー メンタムATCC 13869	27.0
プレバクテリウム・ラクトファー メンタムATCC 13869/pEgIIA-2	29.0
プレバクテリウム・ラクトファー メンタムATCC 13869/pCgIIA-1	30.2

(b) (a)の生産培地Aのグルコースの代わりに蔗糖(グルコース換算)6%を用い、培養開始時にペニシリンG 5単位/ml添加する以外は前記(a)と同様に培養し、L-グルタミン酸生成量を測定した。培養液中に蓄積したL-グルタミン酸量を第2表に示す。

(9)

特公平7-121228

第 2 表

菌株	17 2 表 L-グルタミン酸 (mg/ml)
コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833	27.6
コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833/pEgltA-2(K70, FERM BP- 1161)	30.0
コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833/pCgltA-1(K71, FERM BP- 1162)	31.0
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868	24.0
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868/pEgltA-2	26.1
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868/pCgltA-1	26.8
プレビバクテリウム・ラクトファー メンタム ATCC 13889	24.6
プレビバクテリウム・ラクトファー メンタム ATCC 13889/pEgltA-2	26.5
プレビバクテリウム・ラクトファー メンタム ATCC 13889/pCgltA-1	27.7

## (9) L-プロリンの生産試験:

コリネバクテリウム・グルタミクム H-3334 (FERM P-6823) およびその pEgltA-2 保有株の L-プロリンの生産試験を下記の方法に従って行った。

グルコース 10g/ℓ、肉エキス 5g/ℓ、ペプトン 10g/ℓ、酵母エキス 3g/ℓ、NaCl 3g/ℓ (pH7.2) の組成を有する種培地 30ml を 250ml 容三角フラスコに入れ、120℃、20分殺菌後、上記菌株をそれぞれ接種して 30℃、220rpm で 24 時間振盪培養した。この種培養 30ml を 2ℓ 容バッフル付三角フラスコ中の生産培地 B (グルコース 100g/ℓ、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g/ℓ、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.5g/ℓ、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10g/ℓ、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 10mg/ℓ、ニコチン酸 10mg/ℓ、チアミン塩酸塩 100μg/ℓ、ピオチン 100μg/ℓ、コーン・ステープ・リカー 20g/ℓ、L-グルタミン酸ソーダ 20g/ℓ および CaCO<sub>3</sub> 30g/ℓ (pH7.4、120℃、20分殺菌) 300ml に植菌して、32℃で 220rpm で 4 日間培養した。培養液中の L-プロリンの定量は Chinard の方法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 199, 91 (1952)) に従った。培養液中に蓄積した L-プロリン生成量は第 3 表に示した通りである。

第 3 表

菌株	18 3 表 L-プロリン (mg/ml)
コリネバクテリウム・グルタミクム H-3334 (FERM P-6823)	18.5
コリネバクテリウム・グルタミクム H-3334/pEgltA-2	20.9

## 発明の効果

本発明によれば、微生物の CS の合成に関与する遺伝子を含む組換え体プラスミドを保有させることにより、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物の L-グルタミン酸または L-プロリンの生産能を向上させることができる。

## 【図面の簡単な説明】

第 1 図は pBgltA-1 および pEgltA-2 の作製工程と各種制限酵素による切断地図を示す。pBgltA-1、pEgltA-2 の白抜部分は pBR322 由来の DNA 断片を、また黒い実線部分は太陽菌の染色体 DNA に由来する CS 遺伝子を含む DNA 断片を表している。

第 2 図は pCE61 および pCgltA-1 の作製工程と各種制限酵素による切断地図を示す。pCE61、pCgltA-1 の白抜部分は pCE54 由来の DNA 断片を、また黒い実線部分はコリネバクテリウム・グルタミクムの染色体 DNA に由来する CS 遺伝子を含む DNA 断片を表している。

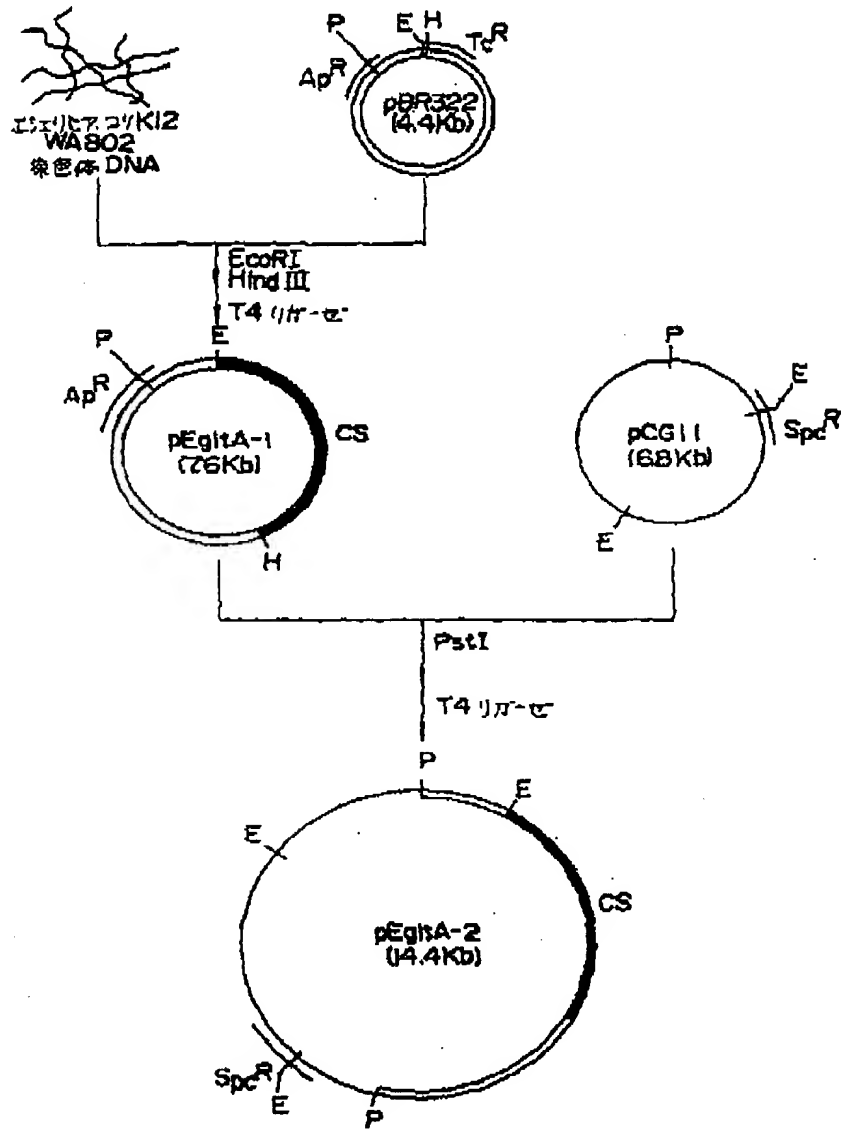
第 3 図は pBgltA-1 および pBgltA-2 の作製工程と各種制限酵素による切断地図を示す。pBgltA-1、pBgltA-2 の白抜部分は pBR322 由来の DNA 断片を、また黒い実線部分は枯草菌の染色体 DNA に由来する CS 遺伝子を含む DNA 断片を表している。

30 図中、E は EcoR I、H は Hind III、P は Pst I、B は Bam H I、Bg は Bgl II を表す。また Bg/B は、Bgl II と Bam H I の同一粘着末端での結合部位を表す。プラスミドの大きさはキロベース (Kb) で表されている。

( 10 )

特公平 7 - 1 2 1 2 2 8

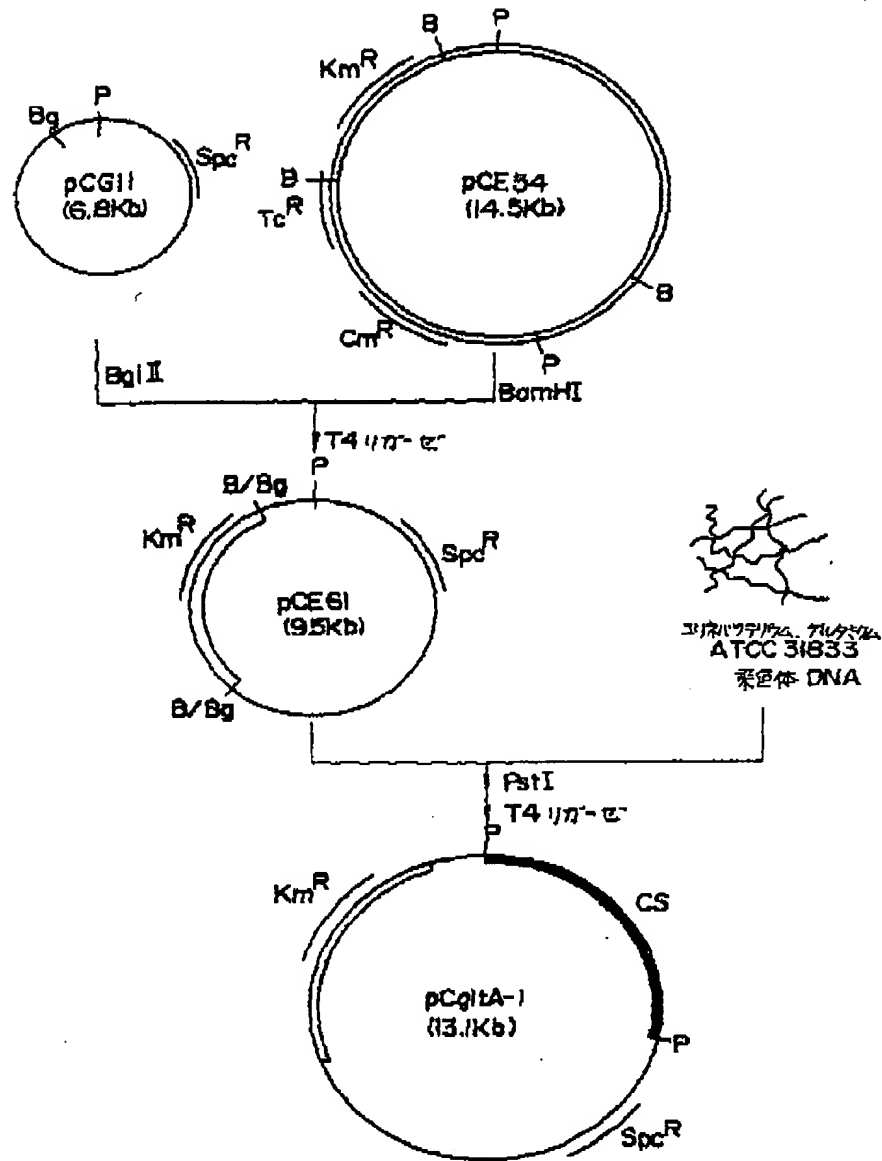
【第 1 図】



特公平7-121228

(11)

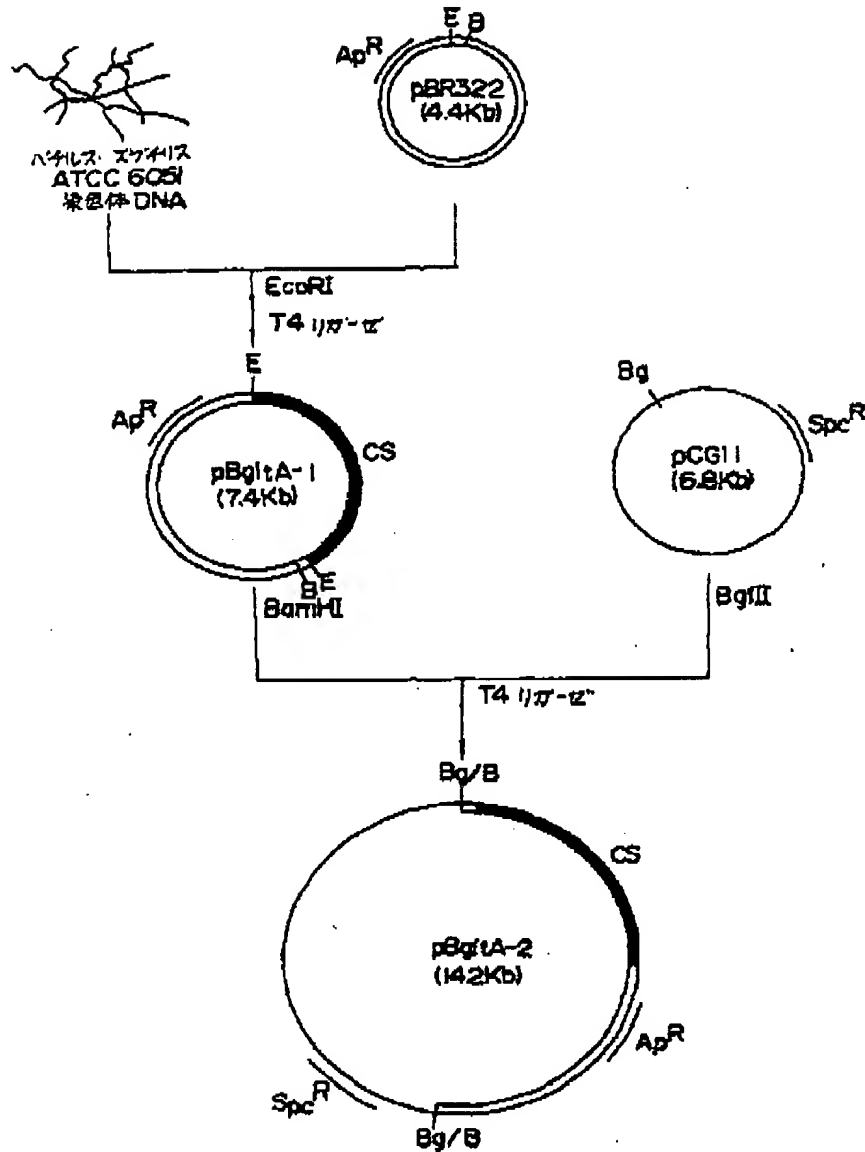
【第2図】



( 12 )

特公平 7-121228

【第 3 図】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.

識別記号

序内整理番号

F I

C12P 13/14

A

C12R 1:13 )

C12P 13/24

A

C12R 1:15 )

C12P 13/24

A

C12R 1:13 )

9281-4B

C12N 15/00

A